

Immunotherapy in the battle against cancer: David versus Goliath?

Citation for published version (APA):

van Elssen, C. H. M. J. (2012). *Immunotherapy in the battle against cancer: David versus Goliath?* [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120309ce>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120309ce](https://doi.org/10.26481/dis.20120309ce)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 9

Summary

Summary

In this thesis we studied various aspects of different immunotherapeutic therapies for cancer *in vitro*. The aim was to improve clinical outcome by combining different immunotherapeutic approaches. We thereby present methods for combination therapy and provide tools to evaluate immunologic responses.

In **chapter 2** we investigated the possibility to utilize passive antibody transfer for ovarian cancer. We show that most ovarian tumors and their metastasis express underglycosylated MUC1 (MUC1-Tn/STn), whereas healthy ovarian cells don't. Therefore, we reason that MUC1-Tn/STn epitopes could serve as tumor-specific antigens, which can be targeted with adoptive transfer of humanized antibodies or DC vaccination in immunotherapy for ovarian cancer.

To optimize DC-based vaccination strategies, we show in **chapter 3** that TLR2/4-matured DCs are superior in inducing T_H1 polarization and additionally induce more MUC1-specific CTLs as compared to PGE2-matured DCs. Additionally, in **chapter 4** we show that these TLR2/4-matured DCs are also superior in interaction with NK cells. This interaction does not only enhance NK cell-mediated cytotoxicity, but also IFN- γ -dependent T_H1 polarization. The use of PGE2 in DC maturation protocols is based on the positive effect of PGE2 on the DC's migratory capacity. Indeed, though TLR2/4-matured DCs are superior in activating immune effector cells, they display a very poor migratory capacity *in vitro*. By analyzing the chemokine profile of these TLR2/4-matured DCs, which produce high amounts of T_H1 , CTL and NK cell-recruiting chemokines we have formed the basis of a new approach for DC vaccination strategies. As opposed to previous reports on enhancement of DC migration, we reason that if *ex vivo* developed DCs are such poor migrators, they should be stimulated to recruit effector cells. For NK cells we show that TLR2/4-matured DCs do this very efficiently in a CCR5-dependent mechanism.

In terms of combination therapy, we investigated possible additional factors produced by tumors, which inhibit antitumor immune responses. One important factor is PGE2, a potent immune suppressor, which is secreted by many solid as well as hematological malignancies. Paradoxically, this is the same factor often used in DC maturation protocols. PGE2 has previously been shown to inhibit both innate as well as adaptive immune

responses. Interestingly, in **chapter 5** we show that PGE2 has also detrimental effects on NK-DC interaction. PGE2 directly affects NK cell function by inhibiting cytotoxicity and cytokine production and also indirectly via DCs it inhibits NK-DC crosstalk. PGE2-matured DCs are less capable of recruiting and activating NK cells, which we have shown in **chapter 4** to be essential for T_H1 polarization.

To evaluate the effect of DC vaccination, we state that different immune responses should be monitored. Next to the conventional T cell monitoring techniques, including DTH-reactions, tetramer staining and cytokine profiles also NK cell activation should be monitored. Additionally, we developed the tools to evaluate humoral immune responses. In **chapter 6** we describe a flow cytometry-based assay to detect human serum antibodies to MUC1 and MUC1-Tn/STn epitopes.

To enhance the effectiveness of cellular immune responses by DC vaccination, we investigated the possibility to develop *ex vivo* generated T cells that are not subjected to tolerance during development. In **chapter 7** we show that we are able to develop these cells that hold the capacity to develop into mature T cells in humanized mice models. Though our data are still preliminary, one could envision that these pre-T cells can be developed into tumor-specific T cells *in vivo* or *ex vivo* to be adoptively transferred.

In conclusion, in this thesis we present an anti-MUC1 strategy for anti-cancer therapy, which could be used in many different patients with either solid tumors or hematological malignancies that express MUC1 (Figure 1). Since we do not expect immunotherapy to be effective by targeting individual immune cells, we propose to combine adoptive antibody therapy with TLR2/4 matured DC vaccination, adoptive pre-T cell transfer and possibly COX2 inhibition to reduce the effect of tumor-derived PGE2 on immune responses. To evaluate immune responses innate as well as adaptive and humoral as well as cellular responses should be monitored.

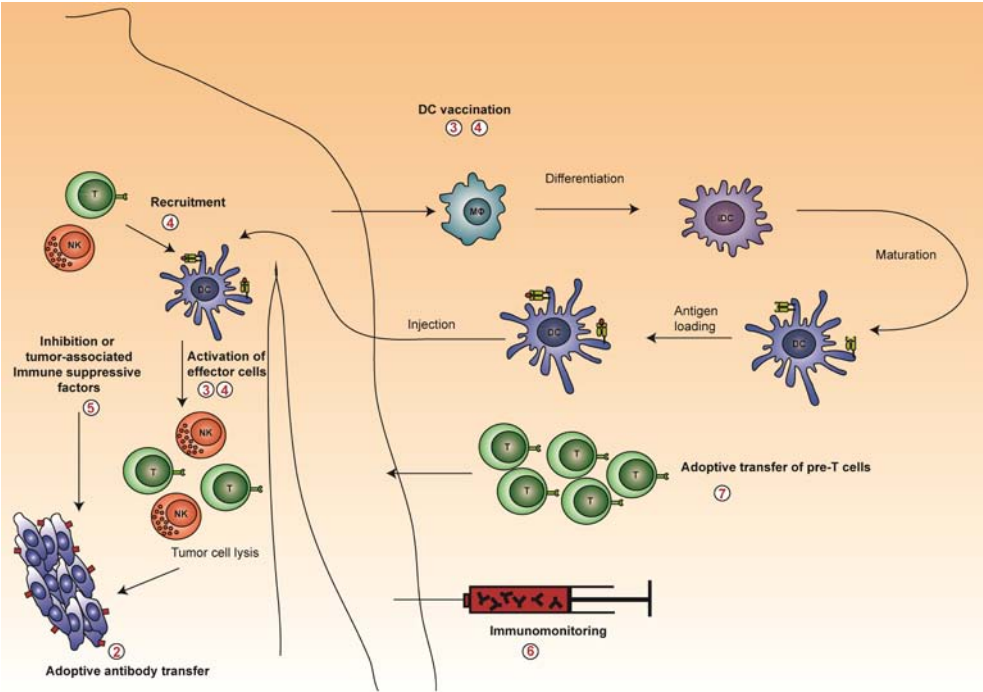


Figure 1. Summary of this thesis: combination therapy

In terms of combination therapy, different immunotherapeutic strategies can be combined. (2) tumors expressing tumor-specific antigens can be targeted by adoptive antibody transfer. (3) DC vaccination can be utilized to induce tumor-specific T cells and (4) activation of NK cells, by recruiting these cells creating a tertiary lymphoid structure, and enhancing their cytotoxic as well as their cytokine secreting capacity. (5) Tumor-derived PGE2, which has immunosuppressive characteristics should be inhibited by COX2- inhibitors. (7) Additionally, to replenish the immune effector population effector cells, like T cells, can be adoptively transferred. (6) Finally, to evaluate immune responses innate as well as adaptive and humoral as well as cellular responses should be monitored. The different numbers also correspond to the different chapters in which the issues were addressed.

Samenvatting

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift hebben we verschillende *in vitro* aspecten van immunotherapie voor kanker bestudeerd met als doel de klinische resultaten te verbeteren door verschillende immunotherapeutische strategieën te combineren. We beschrijven nieuwe methodes die als combinatietherapie gebruikt kunnen worden voor kanker patiënten. Daarnaast presenteren we een innovatieve manier om immuunresponsen te analyseren.

In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of antilichaam therapie effectief kan zijn voor patienten met ovarium tumoren. Eén van de vereisten hiervoor is de expressie van tumorgeassocieerde antilichamen door de tumorcellen. In deze context hebben we aangetoond dat de meerderheid van de ovariumtumorcellen ondergeglycosyleerd MUC1 (MUC1-Tn/STn) tot expressie brengen. Niet alleen de primaire tumoren zijn hiermee mogelijk gevoelig voor antilichaamtherapie, maar ook de metastasen brengen dit ondergeglycosyleerde MUC1 tot expressie, terwijl gezonde ovarium cellen dit niet doen. Hieruit concluderen we dat de MUC1-Tn/STn epitopen gebruikt kunnen worden als tumorspecifieke antigenen in ovarium kanker en dat deze antigenen getarget kunnen worden met antilichamen of middels DC vaccinatie strategieën.

Ter optimalisatie van DC vaccinatie strategieën laten we in **hoofdstuk 3** zien dat TLR2/4 gematureerde DCs superieur zijn aan PGE2 gematureerde DCs. TLR2/4 gematureerde DCs induceren voornamelijk T_H1 polarisatie en induceren meer antigeenspecifieke CTLs. Daarnaast laten we in **hoofdstuk 4** zien dat deze TLR2/4 gematureerde DCs ook veel beter zijn in de communicatie met NK cellen. Hierbij ontstaat er een bidirectionele activatie van DCs en NK cellen, waarbij NK cellen gestimuleerd worden tot het induceren van celgemedieerde cytotoxiciteit en inductie van $IFN-\gamma$ afhankelijke T_H1 polarisatie. PGE2 wordt frequent gebruikt in DC maturatie protocollen, gezien het positieve effect op de *in vitro* migratie van DCs. In vergelijking met PGE2 gematureerde DCs vertonen TLR2/4 gematureerde DCs inderdaad een vele slechtere capaciteit tot migreren. Echter, bij analyse van het chemokine profiel van deze TLR2/4 gematureerde DCs blijkt dat deze grote hoeveelheden aan T_H1 , CTL en NK celrekruterende chemokines produceren. Deze data leggen de basis voor een nieuwe strategie voor DC vaccinatie, waarbij het migrerend vermogen van de DC niet meer centraal staat, maar juist het rekruterend vermogen veel

belangrijker is. Voor TLR2/4 gematureerde DCs laten we zien dat ze NK cellen rekruteren middels eens CCR5 gemedieerd mechanisme.

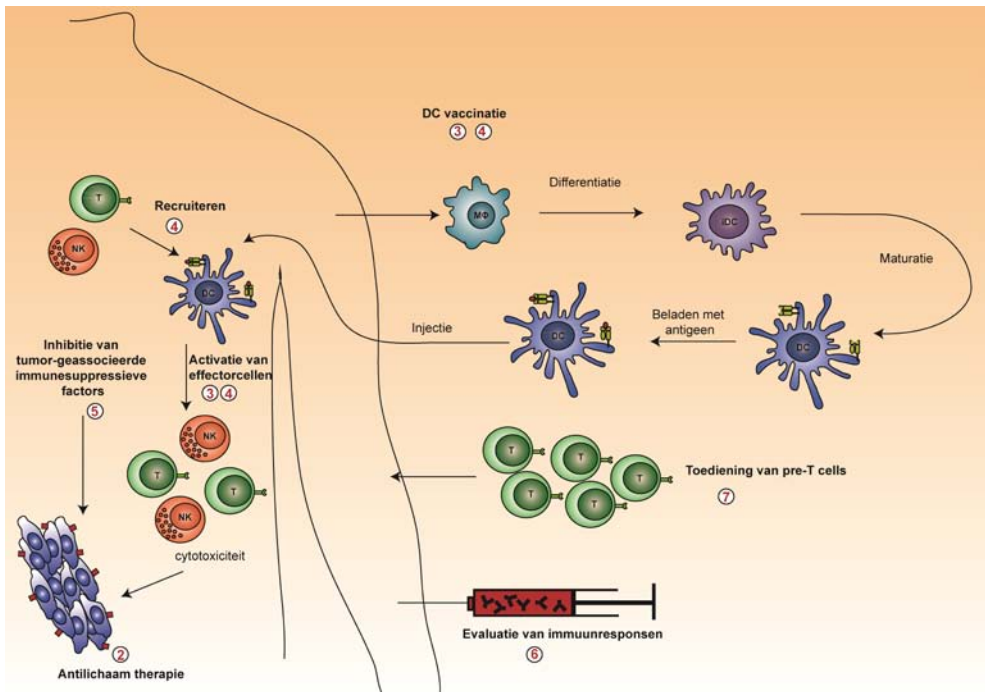
In relatie tot combinatie therapie hebben we additionele factoren onderzocht die geproduceerd worden door tumoren en die een negatieve invloed hebben op de immuunrespons. Gezien de negatieve effecten van PGE2 op DC maturatie en gezien veel solide tumoren evenals hematologische maligniteiten hoge concentraties PGE2 produceren hebben we het effect van PGE2 op NK-DC interactie verder bestudeerd. Van PGE2 is bewezen dat het zowel de aangeboren als de verworven immuniteit negatief kan beïnvloeden. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat PGE2 een negatief effect heeft op NK-DC interactie. PGE2 heeft een direct effect op NK cellen, waarbij de cytokine secretie en cytotoxiciteit van NK cellen gehinibeerd wordt en daarnaast inhibeert PGE2 ook NK-DC interactie door de negatieve invloed van PGE2 op DC maturatie.

Om te evalueren of DC vaccinatie succesvol is, is het van belang dat naast de klinische responsen ook de immunologische responsen geëvalueerd worden. Naast de conventionele methoden waarbij T cel activatie geanalyseerd wordt, middels DTH-reacties, tetrameer analyse en cytokine profiel, moeten ook NK cell responsen worden geëvalueerd. Daarnaast hebben we een nieuwe methode ontwikkeld om humorale immuunresponsen te analyseren. In hoofdstuk 6 beschrijven we deze op flow cytometrie gebaseerd methode, waarbij humane serum antilichamen tegen MUC1 en MUC1-Tn/STn epitopen gedetecteerd kunnen worden.

Om de effectiviteit van de cellulaire immuunresponsen die door DC vaccinatie geïnduceerd worden te verbeteren hebben we gepoogd om T cellen *ex vivo* te genereren uit stamcellen. Hiermee kunnen T cellen gemaakt kunnen worden die tijdens hun ontwikkeling niet onder druk van immuunsuppressie staan. In **hoofdstuk 7** laten we zien dat we *ex vivo* pre-T cellen kunnen ontwikkelen die in staat zijn uit te groeien tot mature T cellen in een gehumaniseerd muis model. Onze data zijn nog steeds preliminair, maar mogelijk kan met deze methode uit *ex vivo* gegenereerde pre-T cellen *in vivo* tumorspecifieke T cellen ontwikkeld worden. Dit zou een potentiële therapieoptie zijn, die in combinatie met een DC vaccine toegediend kan worden.

In dit promotieonderzoek presenteren we een anti-MUC1 strategie die toegepast kan worden in patiënten met solide tumoren evenals in patiënten met hematologische

maligniteiten (Figuur 2). Gezien we ervan overtuigd zijn dat immunotherapie alleen succesvol zal zijn indien meerdere strategieën gecombineerd worden en daarmee ook verschillende immuuncellen getarget worden, stellen we voor om antilichaam therapie te combineren met DC vaccinatie, pre-T cell toediening en COX2-inhibitie om het effect van PGE2 te onderdrukken. Om het effect van deze therapie te evalueren dienen naast klinische responsen ook de immunologische responsen geëvalueerd te worden.



Figuur 2. Samenvatting van dit proefschrift: combinatie therapie

Voor combinatietherapie kunnen verschillende immunotherapeutische strategieën gecombineerd worden. (2) Tumoren brengen tumorspecifieke antigenen tot expressie, die getarget kunnen worden middels antilichaam therapie. (3) DC vaccinatie kan gebruikt worden om tumorspecifieke T cellen te induceren en om (4) activatie van NK cellen te bewerkstelligen. Hiervoor zullen beide cellen door de DC gerekruteerd moeten worden, waarbij een tertiaire lymfoïde structuur gevormd wordt. (5) PGE2 dat geproduceerd wordt door veel tumoren, heeft een immuunsuppressieve invloed, hetgeen middels COX2-inhibitoren opgeheven kan worden. (7) Om het T cel repertoire aan te vullen, kunnen deze effectorcellen *ex vivo* worden gegenereerd om samen met een DC vaccine toegediend te worden. (6) Als laatste dienen cellulaire evenals humorale immuunresponsen geëvalueerd te worden. De verschillende nummers corresponderen met de hoofdstukken waarin de onderwerpen besproken worden.